

PENGARUH CO₂ TERHADAP LAJU PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN LIPID *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* PADA MEDIA AIR LAUT

EFFECTS OF CO₂ ON THE GROWTH RATE AND LIPID CONTENT OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* IN SEAWATER MEDIUM

Verina J. Wargadalam, Edi Saadudin dan Silvy R. Fitri

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Ketenagalistrikan, Energi Baru, Terbarukan dan Konservasi Energi
Jl. Ciledug Raya Kav. 109, Telp. (021) 7203530, Cipulir Keb. Lama, Jakarta Selatan
vwarga@cbn.net.id

Diterima : 15-02-2014, Disetujui : 28-03-2015

ABSTRAK

Mikroalga sebagai salah satu opsi penyedia sumber bahan bakar nabati telah banyak diteliti. Salah satu yang perlu diperhatikan untuk keberlanjutannya adalah sangat besarnya kebutuhan air yang harus disediakan dalam proses budidaya. Untuk menghindari kompetisi kebutuhan air tersebut, budidaya mikroalga dalam media air laut/salin dapat dipertimbangkan. Penelitian ini mempelajari pengaruh penambahan CO₂ terhadap laju pertumbuhan dan kandungan lipid mikroalga *Botryococcus braunii* Kützting strain NIES-836 yang dibudidaya dalam media salin dengan sistem terbuka. Penambahan CO₂ sebesar 2% hingga 20% meningkatkan laju pertumbuhan spesifik, dengan nilai tertinggi dicapai pada penambahan 2% CO₂, yaitu 0,53/hari, dan laju pertumbuhan mulai menurun signifikan pada penambahan 20% CO₂. Produksi lipid tertinggi yang dapat dipulihkan juga dicapai pada penambahan 2% CO₂, yaitu sebesar 0,34 g/L. Kandungan asam lemak dalam total lipid diketahui hanya mencapai 25% dengan komposisi utamanya Metil Palmitat, Metil Palmitoleat dan Metil Oleat.

Kata kunci: *Botryococcus braunii*, CO₂, laju pertumbuhan, lipid, air laut

ABSTRACT

Microalgae as an alternative resource for biofuel have attracted many research works, and one of the concerns is its sustainability due to the need of a huge amount of water in the cultivation process. To avoid such water competition, cultivation of microalgae in media of saline/sea water can be considered. In this works, the effects of CO₂ on the growth and lipid accumulation of Botryococcus braunii Kützting strain NIES-836 in sea water/saline media and open system have been studied. The CO₂ additions of 2% to 20% were found to increase the specific growth rate. The highest value was reached at 2% CO₂ addition, i.e.: 0.53/day, whereas, the specific growth rate started to decrease significantly at 20% CO₂ addition. The highest lipid production that could be recovered was 0.34 g/L, and that was observed at 2% CO₂ addition. The fatty acid content in the total lipid was 25%, mainly consists of Methyl Palmitate, Methyl Palmitoleate, and Methyl Oleate.

Keywords: *Botryococcus braunii*, CO₂, growth rate, lipid, sea water

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Mikroalga sebagai sumber bahan bakar nabati sudah banyak teliti, dengan salah satu karakteristik yang menarik perhatian adalah kandungan minyak nabatinya. Dalam pengembangan sumber-sumber bahan bakar nabati

faktor keberlanjutan perlu diperhatikan, dan biasanya faktor ini sangat terkait dengan kondisi setempat. Air yang merupakan komponen penting pada budidaya mikroalga, banyak dibutuhkan oleh sektor lain khususnya dalam penyediaan air bersih. Untuk menghindari konflik kebutuhan air, mikroalga jenis air tawar dapat dikembangkan

sebagai bagian dari proses pengolahan air bersih (Faridha, 2013). Bagi Indonesia sebagai negara kepulauan, mikroalga yang dapat tumbuh dalam media air laut ataupun salin bisa menjadi pilihan tepat untuk keberlanjutan pengembangan mikroalga sebagai bahan bakar nabati.

Botryococcus braunii Kützting, spesies mikroalga hijau dan berkoloni yang umumnya tumbuh pada media tawar, payau, maupun salin, diketahui bisa mempunyai kandungan minyak hingga 75% dari berat keringnya (Banerjee, drr, 2002; Senousy, drr, 2004). Pengembangan *Botryococcus braunii* pada media salin telah banyak diteliti. *Botryococcus braunii* diketahui dapat beradaptasi pada media dengan tingkat salinitas hingga 85mM (Ranga Rao, drr, 2007).

Selanjutnya, proses fotosintesis pada mikroalga membutuhkan CO₂, dimana emisi CO₂ diketahui merupakan salah satu penyebab pemanasan global. Pemanfaatan gas CO₂ pada sistem budidaya mikroalga untuk memproduksi bahan bakar nabati sebagai pengganti bahan bakar fosil diharapkan dapat mengurangi emisi gas rumah kaca.

Tujuan

Pada penelitian ini dipelajari pengaruh penambahan CO₂ terhadap laju pertumbuhan *Botryococcus braunii* Kützting yang dibudidayakan pada sistem terbuka dalam media salin, dan terhadap kandungan total lipid yang dapat dipulihkan, serta karakteristik lipidnya. Istilah lipid pada penelitian ini adalah semua komponen yang dapat larut dalam pelarut organik.

METODE

Spesies yang digunakan pada penelitian ini adalah *Botryococcus braunii* Kützting strain NIES-836 yang diperoleh dari *National Institute for Environmental Studies*, Japan.

Rancangan Eksperimen

- Pengaruh CO₂ terhadap laju pertumbuhan *B. braunii* diamati dengan penambahan gas CO₂ murni kedalam sistem aerasi budidaya pada laju alir gas bervariasi. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Eksperimen dilakukan dengan budidaya menggunakan bak terbuka, diaerasi dengan laju alir 0,05 vvm udara yang mengandung gas CO₂ dengan variasi berikut: 2%, 10%, 15% dan 20%, dan sebagai kontrol adalah 0% selama 8 jam dari pagi sampai sore hari. Masing-masing

perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

- Pengaruh CO₂ terhadap kandungan total lipid yang terpulihkan dilakukan hanya pada perlakuan penambahan CO₂ yang memberikan laju pertumbuhan optimal dari eksperimen sebelumnya.

Kultur

Budidaya *B. braunii* dilakukan dalam 100 L media kultur dengan salinitas 20 ppt dengan nutrisi Cowny, dan pH dijaga sekitar 8,3 - 8,4 seperti yang dijelaskan sebelumnya oleh Saadudin, drr (2011). Laju alir aerasi 0,05 vvm dialirkan secara terus menerus, sementara CO₂ dialirkan selama 8 jam pada siang hari. Temperatur rata-rata selama eksperimen berkisar antara 26° - 33°C.

Pengambilan Sampel

Laju pertumbuhan diamati dengan menghitung kepadatan sel setiap 2 hari menggunakan hemasitometer untuk tiap perlakuan.

Pengaruh terhadap kandungan minyak diamati dengan pengambilan sampel biomassa pada: awal fasa pertumbuhan (eksponensial) pada hari ke-5, awal fasa stasioner pada hari ke-10, dan akhir fasa stasioner pada hari ke-13. Metode pengambilan sampel biomassa dilakukan dengan cara penambahan NaOH pada kultur sampai pH 9, kemudian dibiarkan selama 7 jam atau sampai biomassa mikroalga mengendap. Setelah mengendap, bagian atas dari kultur (berwarna bening) dibuang, sedangkan sisanya berupa endapan biomassa disaring menggunakan kantung saringan (*filter bag*). Pasta biomassa selanjutnya dikeringkan dalam oven sehingga menjadi biomassa kering.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara melarutkan biomassa kering dalam campuran heksana:eter (20 mL:20 mL). Biomassa yang sudah bercampur dengan pelarut diletakkan dalam *shaker* selama 24 jam. Kemudian disentrifugasi untuk memisahkan residu biomassa dengan cairan. Selanjutnya cairan diambil dan dievaporasi untuk membersihkannya dari pelarut.

Analisis Lipid

Untuk menganalisis lipid hasil ekstraksi, perlu dilakukan preparasi pada sampel. Ekstrak lipid di transmetilasi dengan larutan methanol BF₃, lalu dipanaskan hingga suhu 60°C. Setelah didinginkan ke suhu ruang, metil ester diekstrak

menggunakan pelarut heksana. Terbentuk dua lapisan, lapisan atas berupa heksana kaya metil ester dipisahkan untuk dianalisis pada GC-MS Shimadzu QP 2010S dengan kolom Rastek RXi-5MS, dengan panjang 30 m, dan temperatur injeksi 290°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Laju Pertumbuhan

Pengaruh penambahan CO₂ terhadap pertumbuhan *B. braunii* NIES-836 ditunjukkan pada Gambar 1. Penambahan CO₂ terlihat meningkatkan kepadatan sel secara signifikan dibanding kultur tanpa penambahan CO₂. Pada konsentrasi CO₂ sebesar 20%, terlihat kepadatan lebih rendah dibanding dengan penambahan CO₂ sebesar 2%, 10% dan 15%.

Pada penelitian ini diaplikasikan model logistik klasik untuk menjelaskan hubungan pertumbuhan alga dengan densitas selnya dengan menggunakan nilai rerata data eksperimen. Model logistik yang dikembangkan oleh Pierre Verhulst menggambarkan suatu laju pertumbuhan populasi tidak hanya dipengaruhi oleh reproduksi tetapi juga oleh densitas populasi yang diinterpretasikan sebagai kompetisi inter-spesifik (Carcano, 2010). Dengan demikian, laju pertumbuhan spesifik (μ) dalam penelitian ini tidak hanya dipengaruhi oleh perubahan kemampuan reproduksi akibat penambahan CO₂ tetapi juga dipengaruhi oleh densitas sel yang terbentuk dalam media. Laju pertumbuhan dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{K}\right) \quad (E-1)$$

dimana, X adalah densitas sel [sel.mL⁻¹], μ adalah laju pertumbuhan spesifik [hr⁻¹], dan K adalah kapasitas kandungan yaitu densitas alga maksimum yang bisa dicapai didalam media [sel.mL⁻¹]. Persamaan ini diintegrasikan menjadi:

$$X(t) = \frac{K}{1 + e^{a-\mu t}} \quad (E-2)$$

dimana, a adalah konstanta model logistik yang menunjukkan kondisi relatif terhadap densitas awal sel.

Selanjutnya laju pertumbuhan dianalisis dengan regresi linear dengan persamaan berikut:

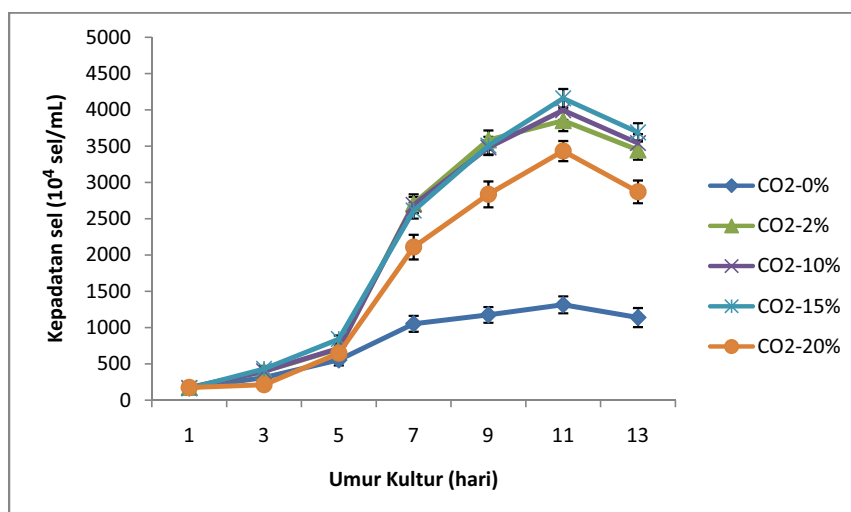
$$\ln\left(\frac{K}{X} - 1\right) = a - \mu t \quad (E-3)$$

Saat densitas alga (X) mencapai separuh densitas maksimumnya (K), laju pertumbuhan sel mencapai nilai maksimum, L_{maks} [sel.(mL hr)⁻¹] dihitung dengan persamaan berikut (Li drr, 2010):

$$L_{maks} = \frac{\mu K}{4} \quad (E-4)$$

Tabel 1 menunjukkan laju pertumbuhan spesifik dan pertumbuhan maksimum *B. braunii* pada beragam konsentrasi CO₂.

Dengan penambahan CO₂, laju pertumbuhan spesifik (μ) meningkat dari 0,42/hari (kontrol) menjadi 0,53/hari pada penambahan 2% CO₂. Tetapi dengan penambahan CO₂ lebih dari 2%, nilai μ cenderung turun ke nilai yang relatif sama, yaitu 0,50/hari, 0,47/hari dan 0,44/hari pada penambahan CO₂ masing-masing 10%, 15%, dan 20%. Sementara laju pertumbuhan maksimum (L_{maks}) dengan penambahan 2% CO₂ meningkat dari



Gambar 1. Pengaruh CO₂ terhadap kepadatan sel *B. braunii* NIES-836

Tabel 1. Laju pertumbuhan spesifik dan laju pertumbuhan maksimum pada variasi penambahan CO₂ pada kultur *B. braunii* NIES-836

Konsentrasi CO ₂ [%]	0	2	10	15	20
μ [hr ⁻¹]	0,42	0,53	0,50	0,47	0,44
R ² (coeff.determination)	0,92	0,87	0,89	0,94	0,85
L _{maks} [10 ⁴ sel.(mL.hr)-1]	139	514	502	500	377

139.10⁴ sel/mL. hari (kontrol) menjadi 514.10⁴ sel/mL.hari. L_{maks} untuk CO₂ 10% dan 15% relatif hampir sama yaitu masing-masing 502 dan 500.10⁴sel/mL.hari. Sementara L_{maks} untuk 20% CO₂ turun menjadi 377.10⁴ sel/mL.hari.

Konsentrasi optimal CO₂ pada budidaya *B. braunii* tergantung pada jenis strainnya. Laju pertumbuhan spesifik *B. braunii* NIES-836 pada penelitian ini mencapai nilai tertingginya pada penambahan 2%CO₂, yaitu sebesar 0,53/hari. Nilai ini lebih tinggi dibanding dengan yang dicapai oleh *B. braunii* Showa sebesar 0,35-0,42/hari pada penambahan CO₂ sebesar 0,2% hingga 0,3% dimana pertumbuhannya berhenti pada penambahan diatas 5% (Yoshimura, drr, 2013). Sementara strain *B. braunii* AP103 dan *B. braunii* SAG-30.81 yang dikultivasi pada sistem terbuka tanpa CO₂ dilaporkan mempunyai laju pertumbuhan spesifik 0,24-0,26/hari (Ashokkumar, drr, 2012; Sydney, drr, 2010).

Dengan demikian, jika suatu sistem budidaya mikroalga *B. braunii* mempunyai sumber CO₂ terbatas maka untuk memacu laju pertumbuhan dapat digunakan konsentrasi CO₂ optimal 2%. Sebaliknya jika sistem budidaya mikroalga ditujukan juga untuk mengurangi emisi CO₂ yang berasal dari suatu proses seperti pembangkit listrik dan lokasinya berdekatan maka penambahan 15% CO₂ bisa menjadi pilihan karena laju

pertumbuhan maksimumnya signifikan lebih tinggi dibanding dengan penambahan 20% CO₂.

Produksi Biomasa dan Kandungan Lipid

Pada eksperimen selanjutnya konsentrasi CO₂ yang digunakan adalah 2% dan 15%, sementara 0% digunakan sebagai kontrol. Tabel 2 menunjukkan pengaruh penambahan CO₂ terhadap produksi biomasa dan kandungan total lipid. Produksi biomasa cenderung meningkat dengan adanya penambahan CO₂. Pada penambahan 2% CO₂, produksi biomasa mencapai nilai maksimumnya 2,5 g/L pada fasa akhir stasioner (hari ke-13), demikian juga pada penambahan 15% CO₂, dengan nilai maksimum 3,1 g/L. Sementara tanpa penambahan CO₂ produksi biomasa maksimum diperoleh pada awal fasa stasioner (hari ke-10) yaitu 2 g/L. Kandungan total lipid pada penambahan 2% CO₂ mencapai nilai maksimumnya sebesar 15,5%-b kering pada hari ke-10, sementara pada penambahan 15% CO₂ kandungan lipid maksimum diperoleh pada hari ke-13, yaitu 9,5%-b kering. Pada fasa akhir stasioner penambahan CO₂ menyebabkan penurunan kandungan lipid.

Produksi maksimum biomasa pada penelitian ini sebanding dengan yang dilaporkan sebelumnya. *B. braunii* AP103 yang di budidaya pada sistem terbuka tanpa penambahan CO₂ mempunyai nilai maksimum 1,8 g/L (Ashokkumar, drr, 2012),

Tabel 2. Pengaruh penambahan CO₂ terhadap produksi biomasa dan kandung total lipid *B. braunii* NIES-836

Hari	Kandungan Biomasa (g/L)			Kandungan Total Lipid (%-b kering)		
	CO ₂ (0%)	CO ₂ (2%)	CO ₂ (15%)	CO ₂ (0%)	CO ₂ (2%)	CO ₂ (15%)
5	1,5±0,18	2,0±0,08	1,7±0,13	8,3±0,78	6,5±0,46	7,8±0,58
10	2,0±0,15	2,2±0,10	2,0±0,20	7,8±0,35	15,5±2,15	9,5±0,50
13	1,8±0,14	2,5±0,13	3,1±0,18	13,5±0,61	11,7±0,44	9,5±0,87

sementara strain LB-765 dengan penambahan CO₂ sebesar 2-20% kedalam kultivasi dengan foto bioreaktor mencapai nilai maksimum 2,31 g/L pada hari ke-25 (Ge drr, 2011). Sementara untuk kandungan total lipid *B. braunii* strain Austin dan Berkeley dilaporkan mempunyai nilai maksimum masing-masing 27 dan 34 %-b kering (Yamaguchi drr, 1987).

Selanjutnya pengaruh penambahan CO₂ terhadap produksi total lipid ditunjukkan pada Gambar 2. Secara umum, penambahan CO₂ meningkatkan produksi lipid. Nilai maksimum diperoleh pada penambahan CO₂ sebesar 2% pada hari ke-10, yaitu 0,34 g/L. Pada akhir fasa stasioner (hari ke 13), penambahan CO₂ masing-masing 2% dan 15% menghasilkan produksi yang sama, yaitu 0,3 g/L.

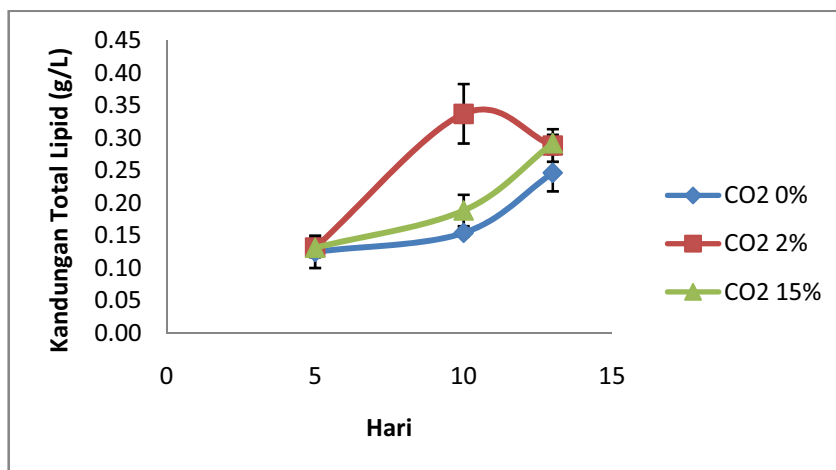
Pada sel yang dikultivasi tanpa CO₂ diperoleh nilai maksimum produksi lipid sebesar 0,24 g/L pada akhir fasa stasioner (hari ke-13). Nilai ini jauh lebih kecil dibanding yang telah dilaporkan sebelumnya untuk *B. braunii* AP103 oleh Ashokkumar, drr (2012), yaitu 0,55 g/L. Hal ini dapat mungkin disebabkan oleh perbedaan teknik ekstraksi yang dilakukan, karena seperti dijelaskan diatas, strain AP103 pada penelitian tersebut mempunyai produksi biomasa yang sebanding.

Karakteristik Lipid

Umumnya lipid didefinisikan sebagai biomolekul yang dapat larut dalam pelarut organik. Lipid yang dihasilkan dari ekstraksi mikroalga dapat mengandung asam lemak, hidrokarbon, sterol, keton, ataupun pigmen (karoten dan klorofil).

Pada pengamatan ini hanya dianalisis satu sampel lipid hasil ekstraksi, yaitu ekstrak yang diperoleh dari kultivasi *B. braunii* pada hari ke-10 dengan penambahan 2% CO₂. Hasil analisis GC-MS menunjukkan kandungan asam lemak metil ester sebanyak 25%, sementara sisanya adalah sangat mungkin berupa lipid netral seperti hidrokarbon, sterol, karoten dan klorofil.

Komposisi asam lemak ditunjukkan dalam Tabel 3. Metil Palmitat merupakan komponen terbanyak yaitu 12,6% dari total lipid, disusul oleh



Gambar 2. Pengaruh CO₂ terhadap produksi lipid *B. braunii* NIES-386

Metil Palmitoleat dan Metil Oleat. Profil asam lemak *B. braunii* hampir serupa dengan asam lemak yang dihasilkan oleh mikroalga *Spirulina sp.* (Saadudin, drr, 2011), tetapi produksi asam lemaknya jauh lebih rendah. Meskipun *B. braunii* diketahui dapat memproduksi total lipid yang tinggi, tetapi karakteristiknya didominasi oleh akumulasi hidrokarbon rantai panjang (C₂₅-C₃₀, n-alkadiena dan triena), pada ras lainnya hidrokarbon yang diakumulasi *B. braunii* dapat berupa hidrokarbon triterpenoida dikenal sebagai *botryococcenes* (C_nH_{2n-10}, n = 30-37), ataupun hidrokarbon C₄₀H₃₇ dikenal sebagai likopadiena (Metzger, drr, 2005).

Dengan demikian, untuk mengkonversi lipid yang diproduksi *B. brauni* menjadi bahan bakar nabati (BBN) dibutuhkan proses hilir yang berbeda dari produksi biodiesel trans-esterifikasi. Dalam hal ini, teknologi ekstraksi hidrokarbon dari mikroalga *B. braunii* menjadi penting, dimana

Tabel 3. Komposisi lipid *B. braunii* NIES-836

Komponen	%-v
Metil Miristat (C14:0)	1,72
Metil Palmitoleat (C16:1)	5,25
Metil Palmitat (C16:0)	12,56
Metil Oleat (C18:1)	3,80
Metil Stearat (C18:0)	1,60
Lipid Netral lainnya	75,07

hidrokarbon tersebut selanjutnya dapat dikonversi melalui proses *hydrotreating ataupun catalytic cracking* untuk menghasilkan biohidrokarbon baik dalam bentuk green biodiesel, biogasolin ataupun bioavtur.

SIMPULAN DAN SARAN

- Pengaruh penambahan CO₂ terhadap laju pertumbuhan dan kandungan lipid *B.braunii* Kützing strain NIES-836 yang dibudidaya dalam media air laut/salin dengan sistem terbuka menunjukkan hal-hal berikut:
- Penambahan CO₂ sebesar 2% hingga 20% meningkatkan laju pertumbuhan spesifik
- Laju pertumbuhan spesifik tertinggi dicapai pada penambahan 2% CO₂, yaitu 0,53/hari, dan laju pertumbuhan mulai menurun signifikan pada penambahan 20% CO₂.
- Produksi lipid tertinggi yang dapat direkoveri juga dicapai pada penambahan 2% CO₂ sebesar 0,34 g/L.
- Kandungan metil ester dalam total lipid yang dianalisa mencapai 25% dengan komposisi utamanya Metil Palmitat, Metil Palmitoleat dan Meil Oleat.

SARAN

- Pemanfaatan *B. braunii* sebagai bahan baku untuk bahan bakar nabati sebaiknya tidak dilakukan melalui proses transesterifikasi, tetapi melalui proses *hydrotreating ataupun catalytic cracking*.
- Kesesuaian jenis mikroalga untuk bahan bakar nabati di Indonesia sebaiknya mempertimbangkan budidaya pada media air laut/salin untuk menghindari konflik ketersediaan air bersih

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Sri Amini, M.Sc., atas masukan dan diskusi mengenai budidaya mikroalga.

ACUAN

- Ashokkumar, V., Rengasamy, R., 2012. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. *Bioresource Technology*. 104:394-399.
- Banerjee A, Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2002. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other

Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22(3):245-279.

Carcano, S., 2010. A Model for Cell Growth in Batch Bioreactors. Disertasi, Facolta di Ingegneria dei Sistemi, Politecnico di Milano

Faridha, 2013. Pemanfaatan Emisi CO₂ PLTU Batubara dan Air Limbah Domestik Yang Terintegrasi Untuk Pertumbuhan Mikroalga sebagai bahan Biodiesel dalam Mendukung Energi Berkelanjutan. Disertasi S3. Universitas Indonesia.

Ge, Y., Liu, J., Tian, G., 2011. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*. 102(1):130-134.

Li, X., Hu, H., Gan ke, Sun, Y., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101(14): 5494-5500.

Metzger, P., Largeau, C., 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66(5):486-496.

Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2007. Effect of Salinity on Growth of Green Alga *Botryococcus braunii* and its Constituents. *Bioresource Technology*. 98(3):560-564.

Saadudin, E., Fitri, S.R., Wargadalam, V.J., 2011. Karakteristik Asam Lemak Mikroalga Untuk Produksi Biodiesel. *Ketenagalistrikan dan Energi Terbarukan*. 10(2):131-140.

Senousy, H.H., Beakes, G.W., Hack, E. 2004. Phylogenetic Placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxioophyceae) and *Botryococcus Sudeticus* Isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 40:412-423.

Sydney, E.B., Sturm, W., Carvalho, J.C., Thomas-Soccol, V., Larroche, C., Pandley, Ashok, Soccol, C.R., 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. 101(15):5892-5896.

- Yamaguchi, K., Nakano, H., Murakami, M., Konosu, S., Nakayama, O., Nakamura, A., Iwamoto, H., 1987. Lipid Composition of green alga, *Botryococcus braunii*. *Agriculture and Biological Chemistry*. 51(2):493-498.
- Yoshimura, T., Okada, S., Honda, M., 2013. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology*. 133: 232-239.

